

GENE FRAGMENT TO CODE ANTI-HIV ANTIBODY VARIABLE RANGE, ANTI-HIV CHIMERA ANTIBODY MANIFESTED BY USING THE SAME FRAGMENT AND PRODUCTION THEREOF

Publication number: JP2002352

Publication date: 1990-01-08

Inventor: MAEDA HIROAKI; EDA YASUYUKI; KURUMI KAZUHIKO; TOKIYOSHI YUKIO; MATSUSHITA SHUZO; HATTORI TOSHIO; TAKATSUKI KIYOSHI

Applicant: CHEMO SERO THERAPEUT RES INST

Classification:

- International: C12P21/08; A61K39/42; A61P31/12; C07K16/10;
C12N5/10; C12N15/09; A61K38/00; C12R1/91;
C12P21/08; A61K39/42; A61P31/00; C07K16/08;
C12N5/10; C12N15/09; A61K38/00; (IPC1-7);
C12N5/00; C12N5/20; C12N15/00; C12N15/13;
C12P21/08

- European: C07K16/10K1D

Application number: JP19880171385 19880708

Priority number(s): JP19880171385 19880708; JP19880020255 19880130

Also published as:

EP0327000 (A2)
 EP0327000 (A3)
 EP0327000 (B)
 AU613699B (B)

Report a data error [here](#)

Abstract of JP2002352

PURPOSE: To obtain the subject gene fragment to code an anti-HIV antibody V range, useful for preparing an anti-HIV chimera antibody, comprising a gene to code H chain containing a gene to code a specific amino acid sequence in part of the gene. CONSTITUTION: A gene fragment to code an anti-HIV antibody V range, comprising a gene to code H chain containing a gene to code an amino acid sequence of (a) Thr Tyr Pro Ile Glu (b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly (c) Thr Gly Ser Ala Tyr Ala (d) Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser part of the gene. One example of the gene fragment is shown by the figure.

Net Ala Thr Ile Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Ile
Gly Val Ala Ser Glu Val Glu Leu Glu Glu Ser Glu Ala Glu Leu
Val Lys Pro Glu Ala Ser Val Lys Net Ser Cys Lys Ala Phe Gly
Thr Thr Phe Thr Tyr Ile Glu Trp Met Lys Glu Ala Ile Ile
Gly Lys Ser Leu Glu Cys Trp Ile Glu Ala Phe His Pro Thr Ser Asp
Asp Thr Asp Tyr Ala Glu Ile Thr Ile Glu Lys Ala Lys Leu Thr
Val Glu Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu
Thr Ser Asp Asp Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His Tyr Gly
Ser Asp Ala Met Asp Tyr Tyr Cys Glu Gly Thr Ser Val Thr
Val Ser Ser

日本発明特許公報: _____

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-2352

⑬ Int. Cl.⁵
 C 12 N 15/13
 5/20
 C 12 P 21/08

識別記号 庁内整理番号
 ZNA 6712-4B※

⑭ 公開 平成2年(1990)1月8日

審査請求 未請求 請求項の数 11 (全22頁)

⑮ 発明の名称 抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片およびこれらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体ならびにその製法

⑯ 特願 昭63-171385

⑰ 出願 昭63(1988)7月8日

優先権主張 ⑧昭63(1988)1月30日⑨日本(JP)⑩特願 昭63-20255

⑪ 発明者 前田 浩明 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2-142 公団4-609

⑪ 発明者 江田 康幸 熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88

⑪ 発明者 来海 和彦 熊本県熊本市京町本丁4-60

⑪ 発明者 時吉 幸男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19

⑪ 出願人 財団法人 化学及清流 熊本県熊本市清水町大庭668番地
療法研究所

⑫ 代理人 弁理士 简井 知

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片およびこれらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体ならびにその製法

2. 特許請求の範囲

(1) 抗HIV中和活性を持つ免疫グロブリンのII鎖可変領域をコードする遺伝子断片であって、少なくとも下記の(a)～(d)のアミノ酸配列をコードする遺伝子配列をその一部に持つ遺伝子断片。

(a) Thr Tyr Pro Ile Glu

(b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn
Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly

(C) Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala

(d) Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Ser Val
Thr Val Ser Ser

(2) 该遺伝子断片が、下記のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含むものである前記第(1)項記載の遺伝子断片。

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro
Ile Glu Trp Met Lys Glu Asn His Gly Lys Ser
Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser
Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
Lys Ala Lys Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser
Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu Thr Ser
Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His
Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
(3) 該遺伝子断片が、下記の遺伝子を含む配列である前記第(2)項記載の遺伝子断片。
CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGG CCT GAG CTG
CTG AAG CCT GGG CCC TCA CTG AAG ATG TCC TGC
AAG GCT TTT GGC TAC ACC TTC ACT ACC TAT CCA
ATA GAG TGG ATG AAA CAG AAT CAT GGG AAG AGC
CTA GAG TGG ATT GGA AAT TTT CAT CCT TAC ACT
GAT GAT ACT AAC TAC AAT GAA AAA TTC AAG GCC
AAG GCC AAA TTG ACT GTA GAA AAA TCC TCT ACC
ACA GTC TAC TTG GAG ACC CGA TTA ACA TCT

GAT GAC TCT GCT GTT TAT TAC TGT GCA ATA CAC
TAC GGT AGT GCC TAC GCT ATG GAC TAC TGG GGT
CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA G

(4) 抗HIV中和活性を持つ免疫グロブリンのL鎖可変領域をコードする遺伝子断片であって、少なくとも下記の(a)～(d)のアミノ酸配列をコードする遺伝子をその一部に持つ遺伝子断片。

(a) Lys Ala Ser Gin Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn

(b) Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

(c) Gin Gin Ser Asn Glu Asp Pro

(d) Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys

(5) 該遺伝子断片が、下記のアミノ酸配列をコードする遺伝子を含むものである前記第(4)項記載の遺伝子断片。

Asp Ile Val Leu Thr Gin Ser Pro Ala Ser Leu
Ala Val Ser Leu Glu Gin Arg Ala Thr Ile Ser
Cys Lys Ala Ser Gin Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gin Gin Lys Pro

(7) H鎖並びにL鎖の定常領域がヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸配列であり、さらにH鎖並びにL鎖の可変領域がそれぞれ下記に示された(a)～(d)のアミノ酸配列をその一部に有するアミノ酸配列からなることを特徴とする抗HIVキメラ抗体。

[H鎖可変領域に含まれるアミノ酸配列] :

(a) Thr Tyr Pro Ile Glu

(b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn
Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly

(C) Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala

(d) Met Asp Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Ser Val
Thr Val Ser Ser

[L鎖可変領域に含まれるアミノ酸配列] :

(a) Lys Ala Ser Gin Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn

(b) Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser

(c) Gin Glu Ser Asn Glu Asp Pro

(d) Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
Ile Lys

(8) H鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列が、そ

Gly Gin Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu
Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Ser Asn Glu Asp Pro
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
Lys

(6) 該遺伝子断片が、下記の遺伝子を含む配列である前記第(5)項記載の遺伝子断片。

GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG
GCT GTG TCT CTA CGG CAG AGG GCC ACC ATC TCC
TGC AAG GCC AGC CAA ACT GTT GAT TAT GAT GGT
GAT AGT TAT ATG AAC TCG TAC CAA CAG AAA CCA
GGA CAG CCA CGG AAA CTC CTC ATC TAT GCT GCA
TCC AAT CTA GAA TCT CGG ATT CCA GCC AGG TTT
AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC
AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAT GCT GCA
ACC TAT TAC TGT CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCA
TTC ACG TTC CGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA
AAA C

それぞれ下記のアミノ酸配列である前記第(7)項記載の抗HIVキメラ抗体。

[H鎖可変領域] :

Gin Val Gin Leu Gin Gin Ser Gly Ala Glu Leu
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys
Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro
Ile Glu Trp Met Lys Gin Asn His Gly Lys Ser
Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser
Asp Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
Lys Ala Lys Leu Thr Val Glu Lys Ser Ser Ser
Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu Thr Ser
Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His
Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
Gin Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

[L鎖可変領域] :

Asp Ile Val Leu Thr Gin Ser Pro Ala Ser Leu
Ala Val Ser Leu Glu Gin Arg Ala Thr Ile Ser
Cys Lys Ala Ser Gin Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gin Gin Lys Pro
Gly Gin Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala

Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe
Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu
Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
Lys

(9) 前記第(1)項記載の遺伝子断片の下流(3'端)にヒト免疫グロブリンのII鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体II鎖をコードする遺伝子と、その上流にアプロモーターを有する発現ベクター、及び前記第(4)項記載の遺伝子断片の下流にヒト免疫グロブリンのL鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子と、その上流にアプロモーターを有する発現ベクターとにより共形質転換されたミエローマ細胞からなる形質転換体。

(10) 前記第(1)項記載の遺伝子断片の下流(3'端)にヒト免疫グロブリンのII鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体II鎖をコードする遺伝子、及び前記第(4)項記載の遺伝子断

片の下流にヒト免疫グロブリンのL鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子の上流にそれぞれアプロモーターを有する発現ベクターにより形質転換されたミエローマ細胞からなる形質転換体。

(11) 前記第(1)項記載の遺伝子断片の下流(3'端)にヒト免疫グロブリンのII鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体II鎖をコードする遺伝子と、前記第(4)項記載の遺伝子断片の下流にヒト免疫グロブリンのL鎖定常領域をコードする遺伝子断片を連結させた抗HIVキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子とを同時にマウスミエローマ細胞で発現・分離させ、これを回収することを特徴とする抗HIVキメラ抗体の製法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するエイズ(AIDS)の治療および予防に期待できる新規な抗HIVキメラ抗体に関する、さらに詳細には、HIVに対し中和抗体を有する抗HIVキメラ抗体の発現に

有効なII鎖及びL鎖の可変領域をコードする遺伝子断片、これを組み込んだ形質転換体、これらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体並びにその製法に関する。

発明の背景

今世紀最大の奇病と形容され、注目を浴びている後天性免疫不全症候群(acquired immune deficiency syndrome; AIDS)は、レトロウイルスに属するヒト免疫不全ウイルス(HIV)に起因するウイルス性疾患である。この疾患は、1981年アメリカCDCの週報にロサンゼルスの男性同性者5人にカリニ肺炎が発症したことに端を発する[Centers for Disease Control: MMWR, 30, p250, (1981)]。その後、この病気はまたたく間に世界中に広がり、世界保健機構(WHO)の集計によれば、1987年8月12日時点においてすでに122ヶ国に発生が認められ、患者総数は6万人を越している。わが国においても1987年9月4日時点で50人の患者が確認され、そのうち28人はすでに死亡している。AIDSがこのように急速に世界中に広がりをみせているにもかか

わらず本病の予防法及び治療法はほとんど確立されていない。

抗HIV剤として、唯一実用化されているものとしてアジドチミジン(AZT)がある[Nature: 326, p430, (1987)]。これは、制ガン剤として合成されたものであり、HIVの逆転写酵素阻害作用に基づく抗HIV剤であるが、生体の造血組織に対する強い毒性を有するため、多くの例で貧血をもたらすことがわかっている。その他、多くの物質が、抗HIV剤の候補として研究が行われているが、有効であり且つ安全な抗HIV剤はまだ開発されているとは言えない。一方、本病予防のためのワクチン開発に関しては盛んに研究が行われているが、これまでに実用可能なワクチン開発に成功したというような報告もない。

このような状況の中で、精血によってHIV陽性となったサラセニアの患者グループと小児のAIDS及びABC(AIDS関連症候群)のグループについてその臨床と中和抗体の関連について報告されている[R. Cucolloら, J. Immunol., 138, p3731, (1987); R.

Guroffら, *Pediatric Research, impress*]. いずれの場合でも中和抗体の検出できる症例においては臨床症状も軽く良好であるが、中和抗体が検出できない症例においては臨床症状が悪化していることが報告されており、*in vivo*においても中和抗体が有効である可能性を示している。また、すでに感染しているヒトにも能動免疫をすべきだと主張している報告もある [Salk J., *Nature*, 327, p473, (1987)].

以上のように、中和活性を有する抗HIV抗体は、*in vivo*における感染の拡大防止や感染細胞の徘徊に役立つ可能性があり、現在、臨床で用いられている抗ウイルス剤等との併用により更に高い効果が得られることが期待される。

従来技術

上記のような抗HIV抗体として、中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術は、これまでにすでに確立されているが、これらは主としてマウス型モノクローナル抗体である。

に進みつつある。免疫グロブリン遺伝子は抗原との結合部位である可変領域(V領域)遺伝子と補体や特定の細胞と相互作用等に関与した生理活性を持つ定常領域(C領域)遺伝子により形成されていることがよく知られている。さらに、V領域遺伝子は、数あるV遺伝子断片群、D遺伝子断片群(L領域ではまだ見つかっていない)及びJ遺伝子断片群の中からそれぞれ1個が選ばれこの順序で並んで結合することによって形成される。各遺伝子断片群の中でどの遺伝子断片が選ばれるかが抗体の特異性を大きく左右する。即ち、抗体の特異性はH鎖とL鎖のV領域遺伝子の中の各遺伝子断片の組合せによって決定される [利根川進, *Nature*, 307, p575 (1983); 本庶佑, *Annual Rev. Immunol.*, 1, p499 (1983) 参照]。従って、ある特定の抗原に対しては、特定のH鎖L鎖のV(D)J遺伝子断片の組合せがあると考えられる。

また、このV領域遺伝子の5'上流域及び3'下流域には免疫グロブリン遺伝子の発現に重要な役割をしていると思われるDNA配列が存在する。即ち、

このようなマウス型モノクローナル抗体の医学分野における免疫学的診断、治療、予防への利用法においては生理活性(補体活性化能や抗体依存性の細胞傷害活性等)や抗原性(マウスモノクローナル抗体をヒトに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用をおこすことが考えられる)等の制約から、これらの実用に際してまだ問題が残されており、このような問題のないヒト型モノクローナル抗体への期待が寄せられている。しかし、ヒト型モノクローナル抗体作製技術はマウス型モノクローナル抗体作製技術ほど進歩しておらず、現状では、特異性においてマウス型モノクローナル抗体よりも優れたヒト型モノクローナル抗体を得ることが困難な場合が多い。さらに、HIVのような危険度の高い抗原に対する抗体は、バイオハザードの面からも、モノクローナル抗体作製のためのリンパ球の原養をヒトに求めるることは望ましくない。

一方、免疫グロブリン遺伝子についての解析は、最近の遺伝子操作技術の急速な発展に伴って急速

V領域遺伝子の5'上流域にはプロモーター機能を有するDNA配列が存在し、3'下流域(J遺伝子断片とC領域遺伝子の間)には免疫グロブリン遺伝子の転写効率を著しく増大させる機能を有するエンハンサーと呼ばれるDNA配列が存在する。これらの領域はマウス及びヒトの免疫グロブリン遺伝子で同定されており、そのDNA配列も明らかにされている [C. Queenら, *Cell*, 33, p741 (1983); J. Banerjiら, *Cell*, 33, p729, (1983); S. D. Gilliesら, *Cell*, 33, p717 (1983); A. C. Haydayら, *Nature*, 307, p334 (1984); L. Emorineら, *Nature*, 304, p447 (1983) 参照]。

最近、先に記したようなマウス型モノクローナル抗体とヒト型モノクローナル抗体のいずれの問題をも解決する方法として、抗原と結合する可変(V)領域はマウスモノクローナル抗体から、抗原性域は免疫原性及び生理活性に関与する定常(C)領域はヒトの抗体からなるマウスヒトキメラ抗体の作製が注目されており、すでにいくつかの報告が見受けられる(特開昭60-155132号、特開昭61-475

00号)。しかしながら、このようなキメラ抗体の作製には、目的的抗原と結合能を持つ抗体分子の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要素となっており、本発明の対象となるHIVに関しては、そのような可変領域のアミノ酸配列、ひいてはHIVに対して中和活性を有する抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが困難であつたため、これまでにHIVに対して有効なキメラ抗体が得られたというような報告は見あたらず、ましてやHIVに対して中和活性を有する抗HIVキメラ抗体の作製に成功した例はない。

発明の目的

このような状況において、本発明者らはHIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を產生する細胞(ハイブリドーマ)から、該抗体の可変領域をコードする遺伝子を分離することに成功し、さらにこれを用いてマウスヒトキメラ抗体の発現を試みた結果、HIVに対して中和活性を有する抗HIVキメラ抗体の作製に成功し、本発明を完成する

120)を精製し、これを免疫原として用い通常のハイブリドーマを作製する方法でハイブリドーマを作製すれば、抗HIVマウスモノクローナル抗体產生細胞を得ることが可能である。更に、このようにして得られた抗HIVマウスモノクローナル抗体產生細胞の中から、HIVに対して中和活性を有するモノクローナル抗体を產生している細胞を選択する。HIVの場合、該ウイルス特有の性質から、このような中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることは容易なことではないが、そのような細胞株として本発明者らは、HIVに対して中和活性を有する抗体を產生するハイブリドーマ54^{TCB1}細胞の確立に成功しており〔松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)〕、これらが本発明の以下の遺伝子調製に用いる最も好ましい細胞株として挙げられる。

本発明の可変領域をコードする遺伝子断片は、このような抗HIV中和モノクローナル抗体產生細胞より、分離され、解析された遺伝子配列である。しかしながら、前にも述べたように、このような

に至った。すなわち本発明は、これまでに一切報告されていない、抗HIV中和抗体の可変領域をコードする遺伝子を提供するものであり、これを用いて形質転換細胞内で発現される抗HIVキメラ抗体を提供するものである。さらに詳細には、本発明は、抗HIV中和活性を持つマウスモノクローナル抗体の抗原結合部位(V領域)とヒト抗体の定常領域(C領域)からなる抗HIVキメラ抗体を提供するものであり、このようにして得られる本発明の抗HIVキメラ抗体は、抗HIV中和活性を有し、かつ副作用のないAIDS診断薬、治療薬、予防薬への応用を可能にするものである。

発明の構成および効果

本発明に用いる抗HIVマウスモノクローナル抗体產生細胞は、これまでに確立されているマウスモノクローナル抗体の作製技術を用いて作製される。例えば、H9/HTLV-III Bで示されるウイルス感染細胞株(ATCC No.CRL8543)や、Mo1c3/HTLV-III B(ATCC No.CRL8602)等の入手可能なウイルス感染細胞より、ウイルス成はウイルス被蛋白分画(env; gp41, gp

細胞は、目的の抗HIV抗体に特異的なV領域をコードする遺伝子の他に、数多いV領域構成遺伝子群を有している(例えば、マウス抗体の特異性を決定するVH鎖のV遺伝子群だけでも少なくとも100種以上異なる遺伝子を持ち、D遺伝子群として11種以上、J遺伝子群として4種の遺伝子を持っている。同様にVK鎖のV遺伝子群としては約300種以上の遺伝子、J遺伝子群としては4種の遺伝子を保有している)ため、細胞の持つ染色体遺伝子の中から、目的的抗HIV抗体に特異的なV領域をコードしている遺伝子を分離することが必要である。このようなく特異性を担っているマウス免疫グロブリンII鎖遺伝子とI鎖遺伝子の可変領域(V)遺伝子を単離する方法としては、主として2つの方法が可能である。1つは、その細胞の染色体DNAから常法[例えば、T. Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab. (1982)参照]に従ってV領域遺伝子をクローニングする方法であり、もう一方は、その細胞のメッセンジャーRNAを材料として常法[例えば、D.M.Glover編集 "DNA cloning Vol. 1" IRL

press (1985)】によりcDNAを合成しV領域遺伝子をクローニングする方法である。いずれの方法も、V領域遺伝子クローニングの為のプローブとして、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列【例えば、坂野ら、Nature, 286, p676, (1980); E.E.Maxら、J. Biol. Chem., 256, p5116, (1981)】を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが出来る。また、前者の方法においては、活性型の発現可能な、即ちV(D)J遺伝子の再配列を終え、メッセンジャーRNAに転写され、さらに蛋白質に翻訳されているV領域遺伝子を同定するためのサザンハイブリダイゼーションを、抗体産生細胞とその親株の染色体DNAを用いて、常法【例えば、T.Maniatis "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Lab. (1982)参照】に従って行い抗体産生細胞に特異的な遺伝子を決定すれば、ようやく目的のV領域遺伝子をクローニングすることが出来る。目的の遺伝子を、前者の染色体DNAから調製した場合には、遺伝子の中にインtronと呼ばれる介在配列を含んでいる。

II類 Lys

アミノ酸配列をコードする遺伝子配列をその一部に有することが見い出された。このような上記のII類、L類に含まれるそれぞれ4種のアミノ酸配列は、抗体分子の結合能を決定する重要なアミノ酸配列と考えられ、このようなアミノ酸配列が、HIVに対する中和活性を有する抗体分子の機能と密接に関連しているものと考えられた。すなわち、本発明の抗HIVキメラ抗体は、II類およびL類の可変領域を構成するアミノ酸配列としてそれぞれ上記のアミノ酸配列をその一部に有することを特徴とする。このような抗HIV中和活性を有する抗体分子の可変領域をコードする遺伝子として、II類、L類それぞれ第6図、第8図のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片がその好ましい一例として挙げられる。また、そのような遺伝子の具体的な塩基配列の一例としては、II類、L類それぞれ第5図、第7図に示された塩基配列が挙げられる。

一方、抗HIVキメラ抗体作製に用いられるヒト免疫グロブリンII類遺伝子並びにL類遺伝子の定常遺

このようにしてクローニングされた抗HIV中和抗体を有する抗体のV領域をコードする遺伝子断片の配列と、他の抗HIV結合能を有さない抗体遺伝子とを比較し遺伝子解析を行なった結果、抗HIV抗体V領域をコードする本発明の遺伝子断片は、その特異的な遺伝子配列として、II類をコードする遺伝子に、

- (a) Thr Tyr Pro Ile Glu
- (b) Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp Asp Thr Asn
Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly
- (C) Tyr Gly Ser Ala Tyr Ala
- (d) Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Ser Val
Thr Val Ser Ser

のアミノ酸配列をコードする遺伝子をその一部に含み、またII類をコードする遺伝子に、

- (a) Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly
Asp Ser Tyr Met Asn
- (b) Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
- (c) Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro
- (d) Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu

域(C)遺伝子は、例えば ARH-77細胞株(ATCC CRL 1621)の様なヒト抗体産生細胞から両様の方法により単離することが出来る。また、C領域遺伝子はその遺伝子内で再配列を行わないで特にヒトC領域遺伝子を単離するためにヒト抗体産生細胞を使う必要はない。単離する方法としては、前述のマウスV領域遺伝子の単離の場合と同じじように主として2つの方法があり、いずれの場合も、C領域遺伝子クローニングの為のプローブとして、すでに報告されているヒト免疫グロブリン遺伝子の核酸塩基配列【例えば、J.W.Ellisonら、Nuc. Acids. Res., 10, p4071, (1982); P.A.Heliterら、Cell, 22, p197 (1980)】を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが可能である。また、C領域遺伝子の種類としては、特に γ 1類、 κ 類に限ったものではなく、 μ 類、 α 類、 τ 2~4類、 λ 類の各類の遺伝子でも可能である。しかし、補体活性化能、抗体依存性細胞傷害活性を期待するならば、 α 類が望ましい。

抗HIVキメラ抗体遺伝子は、II類遺伝子もL類遺伝

子も、基本的に上記2種の遺伝子断片(V領域遺伝子とC領域遺伝子)を結合させることにより構成される。さらに、遺伝子の単離法に応じて、主として2つ結合の組合せがある。即ち、染色体DNAから単離したVとC領域遺伝子、cDNAから単離したVとC領域遺伝子の組合せである。

例えば、マウス染色体DNAから単離したV領域遺伝子を、ヒト染色体DNAから単離したC領域遺伝子と結合させた場合、マウスV領域遺伝子には発現に必要なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を含んでいることが好ましい。ただし、プロモーターやエンハンサー等はマウス由来である必要はなく、ヒト由来でもウイルス由来でも差しつかえない。また、アロモーターはV領域の5'上流域に位置し、エンハンサーはV領域遺伝子とC領域遺伝子の間に位置するのが好ましいが、エンハンサーについては必ずしもこの位置に限定されるものではない。

一方、マウスcDNAから単離したV領域遺伝子を、ヒトcDNAから単離したC領域遺伝子と結合させる場

合、その結合部分は適当な制限酵素サイトや、必要であれば適当な合成リinkerを用いて、V領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列とC領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列がずれないよう、またV領域アミノ酸配列とC領域アミノ酸配列が変化しないよう結合しなければならない。さらに、動物細胞中で発現を可能にするための適当なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を遺伝子の5'上流域に付加してやる必要がある。

このようにして作製したキメラ抗体遺伝子を、例えばpSV2-gpt [R. C. Mulliganら、Proc. NAS. USA, 78, p2027 (1981)]、pSV2-neo [P. J. Southernら、J. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982)]等の選択マークーの付いた適当なベクタープラスミドに、或は、宿主細胞内でアラスミド状態で増殖できるウイルス遺伝子の一部(バビローマウイルスなど)を持ったベクターアラスミドに、II類遺伝子とI類遺伝子を別々に、あるいは同時に組み込み、キメラ抗体遺伝子アラスミドを構築することが望ましい。

抗HIVキメラ抗体を得るためにには、このようにして調製されたキメラ抗体遺伝子を含むアラスミドを用いて宿主動物細胞を形質転換することが必要である。宿主動物細胞としては、不死化されたマウスおよび他の動物細胞、好ましくはBリンパ系細胞株〔例えばP3X63Ag8-653(ATCC CRL 1580)、P3X63Ag8-U-1(ATCC CRL 1597)、P3/NS1/I-Ag4-1(ATCC CRL 18)、Sp2/0-Ag12(ATCC CRL 1581)等の形質細胞、ハイブリドーマ〕である。DNAによる細胞の形質転換方法としては、DEAE-デキストラン法、燐酸カルシウム共沈降法、アプロアラスト融合法、エレクトロポレーション法等の方法〔例えばB.D. Maxeら著集“Transcription and Translation” IRL Press (1984)参照〕があり、いずれの方法でもよい。II類とI類のキメラ抗体遺伝子を同時に持つアラスミドで形質転換を行う場合には選択マークーはI種類でよいが、II類I類別々の場合には2種類のマークーが必要である。この場合には1つのアラスミドで形質転換を行った後に、さらにもう一方のアラスミドで形質転換を行う二重形質転換法

を用いるのが好ましい。

このようにして形質転換された細胞を通常のハイブリドーマと同じ適当な条件下(例えば、10%牛胎児血清を含む RPMI-1640培地)で培養すれば、この細胞から通常のハイブリドーマの産生する抗体と同様に抗HIVキメラ抗体が分倍産生される。このキメラ抗体は通常の抗体と同様な方法により精製することが出来る。

このようにして得られる本発明のキメラ抗体は、HIVに対して中和活性を有していることが理認され、本発明により、これまでになかった抗HIVキメラ抗体を調製することが可能となる。このような抗HIVキメラ抗体は、AIDSの臨床において、これまでになかった実質的に有効なAIDS治療剤となりうるものである。さらに、本発明により提供される抗HIV抗体可変領域をコードする遺伝子断片は、HIVに対して中和活性を有する抗体分子の可変領域の特異的アミノ酸配列もしくはDNA配列を開示するものであり、今後、さらに進んだ遺伝子組換え技術を応用して目的の抗体分子を修飾、または一部置換等

することにより、より優れた抗HIV中和抗体を有する組換え抗体分子の発現を可能にするものである。次に、その実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例

(1) 抗HIVマウスモノクローナル抗体の作製

抗HIVマウスモノクローナル抗体を产生するハイブリドーマの作製方法は以下に示す通りである。即ち、加熱不活化した精製ウイルス(HTLV-III B)及びConA-セファローズ(ファルマシア社)とイムノアフィニティセファローズを組み合わせて精製したウイルス糖蛋白分画を免疫原として用いて、BALB/cマウスを4回免疫後、脾細胞を探取し、X63マウスミエローマ細胞とボリエチレングリコール(シグマ社)を用いて細胞融合を行いクローニングした。得られたクローンの培養上清中の抗体のHTLV-III B蛋白への結合活性を酵素抗体法にて測定し、反応が陽性と思われるクローンについて、さらに、ウエスタンプロット法及び間接蛍光法を用いて確認し、抗HIVモノクローナル抗体(0.5B抗体)を產生

单離については、以下のように行った。54'CB1細胞、X63細胞及びBALB/cマウス肝臓細胞から N. Blin and D.W. Stafford の方法 [Nuc. Acids. Res., 3, p2303 (1976)] に従って染色体DNAを単離し、各染色体DNA $10\mu g$ を制限酵素EcoRI(宝酒造製；以下本実施例で使用した試薬は、特に断わりのない限り宝酒造製あるいは東洋紡製を使用した)で切斷する。制限酵素切斷DNAを電気泳動で0.7%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス、MEN-リサーチ・プロダクト)に転写後、マウスJII領域を含んだ $[^{32}P]$ 標識合成DNAアローブ[坂野ら、Nature, 286, p676 (1980)]とサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの方法はジーンスクリーンプラスに付属していたマニュアルのプロトコールに従った。各細胞のDNAに検出されたバンドを比較した結果、マウスJIIアローブを用いた場合、3.3kbのバンドが、54'CB1細胞に特異的なバンドとして同定された。このバンドは機能的なVII領域を含む活性な遺伝子であり、54'CB1細胞の

するハイブリドーマ、54'CB1細胞を確立した[松下修三ら、Medical Immunology, 3, p14, (1987)]。

該モノクローナル抗体(0.5B抗体)の認識する分子は、交差免疫沈降法にてHIVに感染したヒトの血清中にある抗gp120抗体が認識する分子と同一のものであることが確認され、0.5B抗体はHIVの外被蛋白gp120に対するモノクローナル抗体であることが証明されている。又、0.5B抗体はHIV感染細胞と非感染CD4陽性細胞間の合胞体形成(syncytium formation)を抑制する。さらに、0.5B抗体とHIVウイルスを混和し細胞(JII)へ感染させるウイルス中和試験において、0.5B抗体は100ng/mlという低濃度で感染を阻止することがわかっている。

以下に述べる本発明の抗HIVキメラ抗体のV領域遺伝子の調製には、該中和活性を有する抗HIVマウスモノクローナル抗体(0.5B抗体)を產生する54'CB1細胞を使用した。

(2) 抗HIV抗体を產生するマウスハイブリドーマからの免疫グロブリンV領域遺伝子の単離

マウス免疫グロブリンV領域遺伝子の

產生する抗HIV抗体の特異性の発現に関与する遺伝子である。分子サイズはスファージDNAをBlnadIIIで切斷したマークーDNAによって算出した。

このサイズに相当するDNA断片をしょ競密度勾配濃心[しょ競密度10~40%(wt/vol), 26000rpm, 18時間, 15°C]により調製した。次にこのDNA断片と入gtl1ベクターDNA(ストラタジーン社)のEcoRIアームとをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、54'CB1細胞のVII遺伝子ライプラリイを得た。このライプラリイから、BentonとDavisのブラークハイブリダイゼーション法[M. D. Benton,

R. W. Davis, Science, 196, p180 (1977)参照]により、マウスJIIアローブにより抗HIV抗体のVII領域遺伝子を含むクローンgll1を選択した。このクローンの制限酵素切斷点地図を第1図に示す。このクローンのEcoRI挿入断片をThomasとDavisの方[M. Thomas, R. W. Davis, J. Mol. Biol., 91, p315 (1974) 参照]によりファージDNAより単離し、以下のノーザンハイブリダイゼーションに

使用した。

54'CB1細胞・X63細胞から全RNAをグアニジウムチオシアネット法 [J. M. Chingwinら, Biochemistry 18, p5294 (1979)] により分離し、このRNA10μgを電気泳動により3%ホルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス)に転写後、マウスC κ 領域を含んだ [32 P] 標識合成DNAアローブ [本庶ら, Cell, 18, p559 (1979)] あるいはgH11の [32 P] 標識EcoRI挿入断片とノーザンハイブリダイゼーションを行った。ノーザンハイブリダイゼーションの方法はジーンスクリーンプラスに付属のマニュアルのプロトコールに従った。この両アローブにより1.8kbの位置にバンドが検出された(第2図)。従って、クローンgH11は機能的なV κ 遺伝子構造を含んでいる。

一方、マウス免疫グロブリン κ 鎖可変(V κ)領域遺伝子の単離については、以下のように行った。54'CB1細胞・X63細胞及びBALB/cマウス肝臓細胞から染色体DNAを H. B11n と D. W. Stafford の方法に

ラトリーズ)のHindIIIアームとをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、54'CB1細胞V κ 遺伝子ライプラリを得た。このライプラリから、BentonとDavisのラーラークハイブリダイゼーション法を使用して、マウスJ κ アローブにより抗HIV抗体のV κ 鎖遺伝子を含むクローンgL41を選択した。このクローンの制限酵素切断点地図を第3図に示す。このクローンのHindIII挿入断片をThomasとDavisの方法によりファージDNAより単離し、ノーザンハイブリダイゼーションに使用した。54'CB1細胞・X63細胞から全RNAをグアニジウムチオシアネット法により分離し、このRNA10μgを電気泳動により3%ホルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス)に転写後、マウスC κ 領域を含んだ [32 P] 標識合成DNAアローブ [E. E. Maxら, J. Biol. Chem., 256, p5116 (1981)] あるいはgL41の [32P] 標識HindIII挿入断片とノーザンハイブリダイゼーションを行った。この

従って単離し、各染色体DNA10μgを制限酵素HindIIIで切断する。この制限酵素切断DNAを電気泳動で0.7%アガロースゲルに展開し、ナイロンメンブレンフィルター(ジーンスクリーンプラス)に転写後、制限酵素HindIII切断DNAはマウスJ κ 領域を含む [32 P] 標識合成DNAアローブ [E. E. Maxら, J. Biol. Chem., 256, p5116 (1981)] とサザンハイブリダイゼーションを行った。各細胞のDNAに検出されたバンドを比較した結果、マウスJ κ アローブを用いた場合、54'CB1細胞のHindIII切断DNAに3.6 kbのバンドが、54'CB1細胞に特異的なバンドとして同定された。このバンドは機能的なV κ 領域を含む活性な遺伝子であり、54'CB1細胞の产生する抗HIV抗体の特異性の発現に関与する遺伝子である。分子サイズは入ファージDNAをHindIIIで切断したマークーDNAによって算出した。

このサイズに相当するDNA断片をしょ掛密度勾配遠心 [しょ掛け10~40% (wt/vol), 26000rpm, 18時間, 15°C] により調製した。次にこのDNA断片とCharen28ベクターDNA(ペセスダ・リサーチ・ラボ

両アローブにより1.2kbの位置にバンドが検出された(第4図)。従って、クローンgL41は機能的なV κ 遺伝子構造を含んでいる。

(3)ヒトC κ 遺伝子の風景

抗HIVキメラ抗体を使用したヒトC κ 領域を含んだ遺伝子、及びヒトC κ 領域を含んだ遺伝子は、ヒト培養細胞ARH77株 [ATCC CRL 1621] よりクローニングされたものであり、九州大学・生体防御医学研究所・波渡武教授より分与された[工藤ら, Gene, 33, p181 (1985); 西村ら, Cancer Res., 47, p999 (1987) 参照]。

(4)抗HIV抗体マウスV κ 領域遺伝子の核酸塩基配列

抗HIV抗体のVII領域の核酸塩基配列を調べるために、クローンgL11よりVII領域を含む1.4kbのDNA断片(HincII-XbaI)を単離し、DNAポリメラース・ラージフラグメント(宝酒造)を用いて両端を平滑末端に変えた後、pUC18ベクターのHincIIサイトに再クローニングし、挿入方向の異なる2つのクローンを得た。これらのクローンをそれぞれ制限酵素KpnIとBamHIで切断し、宝酒造キロシークエンス

用デリーションキットを用いて BamHI サイトから のデリーションの程度が異なるデリーションミュータントクローニングを選択し、それぞれのクローニングを制限酵素 EcoRI と HindIII で切断することにより長さの異なる VII 遺伝子断片群を得た。これらの VII 遺伝子断片群を M13mp19ベクターの EcoRI - HindIII サイトに宝ライダーショニングキットを用いて挿入した。

東洋紡インストラクトマニュアルの方法に従い、 JM101 のコンビテント細胞を調製し、VII 遺伝子群を挿入した M13mp19DNA で形質転換させ、一本鎖 DNA を抽出精製した。さらにこの一本鎖 DNA の核酸塩基配列決定は、タカラ M13 シークエンシングキットと富士・ジェンサー・ゲル・システムを用いて行った。その結果、2つのエクソンからなる VII 遺伝子が確認された。第 5 図にその結果を示す。

塩基配列の結果から、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターに必須であると言われている ATGCCAAT のオクタマー配列が存在し、V 遺伝子断片、D 遺伝子断片と JH4 遺伝子断片が集合して VII 遺伝子が形

は制限酵素 SacI と SmaI で切断し、もう一方(逆方向)は制限酵素 SacI と AccI で切断し、宝酒造キロシークエンス用デリーションキットを用いて SmaI あるいは AccI サイトからのデリーションの程度が異なるデリーションミュータントクローニングを選択し、それぞれのクローニングを制限酵素 EcoRI と HindIII で切断することにより長さの異なる Vκ 遺伝子断片群を得た。これらの Vκ 遺伝子断片群を M13mp19ベクターの EcoRI - HindIII サイトに宝ライダーショニングキットを用いて挿入した。

東洋紡インストラクトマニュアルの方法に従い、 JM101 のコンビテント細胞を調製し、Vκ 遺伝子群を挿入した M13mp19DNA で形質転換させ、一本鎖 DNA を抽出精製した。さらにこの一本鎖 DNA の核酸塩基配列決定は、タカラ M13 シークエンシングキットと富士・ジェンサー・ゲル・システムを用いて行った。その結果、2つのエクソンからなる Vκ 遺伝子が確認された。その結果を第 7 図に示す。

塩基配列の結果から、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターに必須であると言われている ATTTGC

がされていることが確認された(第 5 図)。

さらに、この核酸塩基配列を基にエクソン部分をアミノ酸に変換したところ、このエクソンがオーアンソーディングフレームをとることが示された(第 6 図)。また、この 0.5B 抗体の N 端の N 端アミノ酸配列を「核酸化学実験講座 2、タンパク質の化学(上)」(日本生化学会編、p313 (1987))に記載のエドマン分解法に従って解析したところ、N 端アミノ酸が何等かの形で修飾されており、解析できなかった。核酸塩基配列から推定される N 端アミノ酸はグルタミンであり、これがビログルタミル化を受けやすいためにエドマン分解ができなかつたものと思われた。

一方、抗 IIV 抗体の Vκ 領域の核酸塩基配列を調べるために、クローニング L4I 上り Vκ 領域を含む 2.0 kb の DNA 断片 (BstEII - HincII) を単離し、DNA ポリメラース・ラージフラグメント(宝酒造)を用いて両端を平滑末端に変えた後、pUC18ベクターの HincII サイトに再クローニングし、挿入方向の異なる 2 つのクローニングを得た。これらのクローニングを一方(正方向)

A7 のオクタマー配列が存在し、V 遺伝子断片と Jκ3 遺伝子断片が集合して Vκ 遺伝子が形成されていることが確認された(第 7 図)。さらに、この核酸塩基配列を基にエクソン部分をアミノ酸に変換したところ、このエクソンがオーアンソーディングフレームをとることが示された(第 8 図)。また、この 0.5B 抗体の N 端の N 端アミノ酸配列を前述のエドマン分解法に従って解析したところ、N 端アミノ酸から 5 つのアミノ酸配列(アスパラギン-イソロイシン-バリン-ロイシン-スレオニン)が決定され、核酸塩基配列から推定される 5 個の N 端アミノ酸配列と一致した(第 8 図参照)。このことからもこの Vκ 遺伝子が発現可能な遺伝子であることを確認した。

(5) 抗 IIV 抗体活性を持つマウス VII 遺伝子とヒト Cγ1 遺伝子を含むプラスミド pSV2-βγ1 の作製

ヒト Cγ1 遺伝子を含む 14 kb の DNA 断片 (XbaI - HpaI) を pUC18ベクターの XbaI - HincII サイトに挿入し、制限酵素 XbaI で切断した後、T4-DNA ポリメラースを用いて切断面を平滑末端に変える。一方、

マウスII類プロモーター領域、マウスVII遺伝子及びマウスII類エンハンサー領域を含む3.3kbのDNA断片(EcoRI-EcoRI)の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に変え、これら2つのDNA断片両端を宝ライダーショニキットを用いて連結し、キメラ抗体II類遺伝子 β - T Iを含むプラスミドを作製した。ついで、このプラスミドを制限酵素BamHIで切断し、アガロースグル電気泳動により β - T I遺伝子断片を単離する。この断片をpSV2'-eptベクター[R. C. Walliganら、*Proc. NAS. USA.* 78, p2072(1981)参照]のBamHIサイトに挿入し、pSV2'- β - T Iを作製した(第9図)。

(6) 抗HIV活性を持つマウスV κ 遺伝子とヒトC κ 遺伝子を含むアラスミドpSV2'- β - κ 及びpSV2'- β - κ 2の作製

pSV2'-neoベクター[P. J. SouthernらJ. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982)参照]は、そのクローニングサイトとしてEcoRI及びBamHIサイトを持っているが、さらにHindIIIサイトもクローニングサイトとして使用できるように改造した。は

酵素HindIIIで切断し、マウスII類プロモーター領域及びマウスV κ 遺伝子を含む3.6kbのHindIII-HindIII DNA断片と宝ライダーショニキットを用いて連結し、pSV2'- β - κ を構築した(第10図)。

また、ヒト免疫グロブリンII類遺伝子のエンハンサーを利用したpSV2'- β - κ 2も同時に構築した。マウスII類プロモーター領域及びマウスV κ 遺伝子を含む3.6kbのHindIII-HindIII DNA断片の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に変え、pUC18ベクターのHincIIサイトに挿入し、マウスV κ 遺伝子断片の5'端のHindIIIサイトをEcoRIサイトに変更した。同様にして、ヒトC κ 遺伝子を含む2.6kbのEcoRI-EcoRI DNA断片の3'端のEcoRIサイトをHindIIIサイトに変更した。次に、この両DNA断片をT4リガーゼを用いてHindIIIサイトで連結し、さらに両端のEcoRIサイトを用いて、pSV2'-neoベクターのEcoRIサイトに組み込んだ。このプラスミドを制限酵素EcoRIで部分切断し、アガロースグル電気泳動を行って、2ヶ所あるBamHIサイトのうちどちらか一方が切断されたDNA断片を単離した。一方、pSV2'- β - T I DNAを制限酵素BamHIで切断し、アガロースグル電気泳動を行って、マウス-ヒトキメラII類遺伝子を含むDNA断片を単離した。このようにして得た2つのDNA断片を宝ライダーショニキットを用いて連結させ、マウスV κ 領域内のBamHIサイトではなくpSV2'-neoベ

じめに、pSV2'-neoベクターを制限酵素HindIIIで切断し、その切断面をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に変え、再びT4-DNAリガーゼを用いて連結し、本来ベクターの保持しているHindIIIサイトを消失させた。次に、このベクターを制限酵素EcoRIとBamHIで切断してアガロースグル電気泳動により約5.0kbのDNA断片を単離した後、pBB322ベクターのEcoRI-BamHIの375bpDNA断片とタカラライダーショニキットを用いて連結して、pSV2'-neoベクターを構築した。

pSV2'-neoベクターを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断した後、マウスV κ のエンハンサー領域を含む1.1kbのHindIII-EcoRI DNA断片[EcoRIサイトは本来XbaIサイトであるが、EcoRIリンクを用いて変化させてある。この遺伝子は、九州大学・生体防衛医学研究所 渡辺武教授より分与された。]と宝ライダーショニキットを用いて連結した。次に、制限酵素EcoRIで切断し、ヒトC κ 遺伝子を含む2.6kbのEcoRI-EcoRI DNA断片とタカラライダーショニキットを用いて連結した。さらに、制限

DNA断片にヒト免疫グロブリンII類遺伝子のエンハンサーを含む1.0kbのEcoRI-EcoRI DNA断片(MuI- β -IpaI DNA断片をEcoRIリンクを用いてEcoRI-EcoRI DNA断片に変化させている。)を宝ライダーショニキットを用いて組み込み、マウスV κ 遺伝子の5'側のEcoRIサイトにエンハンサーDNA断片が挿入されたプラスミドを選別し、pSV2'- β - κ 2を構築した(第11図)。

(7) 抗HIV活性を持つマウス-ヒトキメラII類遺伝子とマウス-ヒトキメラI類遺伝子を含むアラスミドpSV2'- β - κ 1の作製

pSV2'- β - κ DNAを制限酵素BamHIで部分切断し、アガロースグル電気泳動を行って、2ヶ所あるBamHIサイトのうちどちらか一方が切断されたDNA断片を単離した。一方、pSV2'- β - T I DNAを制限酵素BamHIで切断し、アガロースグル電気泳動を行って、マウス-ヒトキメラII類遺伝子を含むDNA断片を単離した。このようにして得た2つのDNA断片を宝ライダーショニキットを用いて連結させ、マウスV κ 領域内のBamHIサイトではなくpSV2'-neoベ

クター内の *Bam*H I サイトにマウスヒトキメラ II 鎌遺伝子を含む DNA 斷片が挿入されたプラスミドを、制限酵素切断点地図の違いにより選別した。こうして、II 鎌 L 鎌 2 つのキメラ抗体遺伝子を含むプラスミド pSV2'- β T 1 κ を作製した(第 1 2 図)。

(8) プラスミド pSV2'- β T 1 . pSV2'- β κ , 及び pSV2'- β κ による形質細胞腫の形質転換

pSV2'- β T 1 , pSV2'- β κ あるいは pSV2'- β κ の DNA を DEAE-デキストラン法 [M. S. Neuberger, EMBO J., 2, p1317 (1983) 参照] により種々の形質細胞腫である P3X63Ag8.653(ATCC CRL 1580), P3X63Ag8U-1(ATCC CRL 1597), P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC CRL18), Sp2/0-Ag12(ATCC CRL1581) 細胞株 [Kohlerら, Nature, 256, p495 (1975); Kohlerら, Eur. J. Immunol., 6, p292 (1976)] 等に導入し形質転換を行った。即ち、形質細胞腫を牛胎児血清(FCS)を含まない DMEM 培地で数回洗浄した後、その 1×10^6 個の細胞を $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ の pSV2'- β T 1 あるいは pSV2'- β κ 2 プラスミド DNA と $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ DEAE-デキストラン(ファルマシア)を含む DMEM2.5 ml に

30 分間浮遊させる。次に、この細胞を FCS を含まない DMEM で数回洗浄した後、10%の FCS を含む RPMI-1640 培地に浮遊させて、24 ウェルプレートにそれぞれ 1 枚ずつ 5×10^5 個の細胞が入るよう分注し、48 時間培養する。その後、pSV2'- β T 1 DNA を導入した場合には、 $6.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のミコフェノール酸(シグマ社)と $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ のキサンチン(シグマ社)と 10% FCS を含む RPMI-1640 培地に、pSV2'- β κ または pSV2'- β κ 2 DNA を導入した場合には、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジネチシン(シグマ社)と 10% FCS を含む RPMI-1640 培地に取り替え、形質転換細胞をそれぞれ選択する。

次に、形質転換細胞をスライドガラス上に固定し、アセトニン-エタノール(1:1)処理した後、蛍光標識抗体 [FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG(γ 領域異性、或は κ 領域異性):Cappel lab. Inc.] で染色して形質転換細胞の細胞質に強く特異的な蛍光染色が認められる細胞を選択し、導入した DNA がヒト T 1 あるいは κ 領域として強く発現している細胞を確立した。

次に、pSV2'- β T 1 DNA で形質転換された細胞には

pSV2'- β κ または pSV2'- β κ 2 DNA, pSV2'- β κ DNA または pSV2'- β κ 2 で形質転換された細胞には pSV2'- β T 1 DNA を、前述した方法に従ってさらに導入し、二重形質転換細胞を得た。

この中からキメラ抗体を產生している細胞を選択するために、抗ヒト IgG 抗体(Cappel lab. Inc.)を用いた酵素免疫測定法(EIA)を行った。即ち、抗ヒト IgG 抗体(Cappel lab. Inc.)をコーティングした PVC 製プラスチックプレート(Falcon3912)に二重形質転換細胞の培養上清を加え、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(Cappel lab. Inc.)を反応させ、TMBZ(3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン:同仁化学)で発色させて、キメラ抗体產生細胞を選択、確立した。

(9) プラスミド pSV2'- β T 1 κ による形質細胞腫の形質転換

pSV2'- β T 1 κ DNA を DEAE-デキストラン法 [M. S. Neuberger, EMBO J., 2, p1317 (1983) 参照] により種々の形質細胞腫である P3X63Ag8.653(ATCC CRL 1580), P3X63Ag8-U1(ATCC CRL 1597),

P3/NS1/1-Ag4-1(ATCC CRL18), Sp2/0-Ag12(ATCC CRL1581) 細胞株 [Kohlerら, Nature, 256, p495 (1975); Kohlerら, Eur. J. Immunol., 6, p292 (1976)] 等に導入し形質転換を行った。即ち、形質細胞腫を牛胎児血清(FCS)を含まない DMEM 培地で数回洗浄した後、その 1×10^6 個の細胞を $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ の DNA と $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ DEAE-デキストラン(ファルマシア)を含む DMEM2.5 ml に 30 分間浮遊させる。次に、この細胞を FCS を含まない DMEM で数回洗浄した後、10%の FCS を含む RPMI-1640 培地に浮遊させて、24 ウェルプレートにそれぞれ 1 枚ずつ 5×10^5 個の細胞が入るよう分注し、48 時間培養する。その後、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジネチシン(シグマ社)と 10% FCS を含む RPMI-1640 培地に取り替え、形質転換細胞を選択した。

この中からキメラ抗体を產生している細胞を選択するために、抗ヒト IgG 抗体(Cappel lab. Inc.)を用いた酵素免疫測定法(EIA)を行った。即ち、抗ヒト IgG 抗体(Cappel lab. Inc.)をコーティングした PVC 製プラスチックプレート(Falcon3912)に形質転換細胞の培養上清を加え、ペルオキシダーゼ標

諸ヤギ抗ヒト IgG(Cappel lab. Inc.)を反応させ、
THBZ(3,3'-5,5'-テトラメチルベンジン:同仁化学)
で発色させて、キメラ抗体産生細胞を選択、確立
した。

(10) 抗HIVキメラ抗体直伝子の発現

このようにして確立したキメラ抗体産生細胞の
産生するキメラ抗体の発現状態を調べるために、酵
素免疫測定法(EIA)、ウエスタンプロット分析、ノ
ーザンプロット分析を行った。

HIVの外皮膜蛋白gp120、抗ヒト α 類抗体(Cappel lab. Inc.)、あるいは抗ヒト β 類抗体(Cappel lab. Inc.)をPVC製プラスチックプレート(Falcon 3912)にコーティングした後、上述のDNAで形質転
換された形質細胞の培養上清を加え、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG(Cappel lab. Inc.)で
反応させた後、THBZ(3,3'-5,5'-テトラメチルベン
ジン:同仁化学)で発色させた結果、キメラ抗体
を産生している全ての形質転換細胞の培養上清は、
HIV外皮膜蛋白gp120と強く反応し、なおかつ抗ヒ
ト α 類抗体及び抗ヒト β 類抗体とも強く反応した。

ヒト $C\gamma 1$ 類遺伝子、及びヒト $C\kappa$ 類遺伝子をアロー
ブに、ノーザンプロット分析を行った。その結果、
第1・3図に示すように $CB1$ 細胞において、 L 鎖では
0.5 β VIIとヒト $C\gamma 1$ アロープでそれぞれ約1.8kbの
一致したバンドが検出され、一方、 L 鎖では0.5 β
 $V\kappa$ とヒト $C\kappa$ アロープでそれぞれ約1.3kbの一一致した
バンドが検出された。のことより、キメラ抗体は
mRNAの段階でキメラ化していることが示唆された。

次に、発現された $CB1$ 抗体の蛋白サイズをウエ
スタンプロット分析により検討した。 $CB1$ 抗体ある
いは正常ヒト IgG抗体を、2ME存在下あるいは非
存在下でSDS-PAGEを行い、ニトロセルロースフィ
ルター(バイオ・ラッド)へトランスファーした。
その後、ヤギ抗ヒト IgG($H+L$)抗体(Cappel lab. Inc.)
を反応させ、次いで、ペルオキシダーゼ標識ヤ
ギ IgG抗体(Cappel lab. Inc.)を使用させ、バイオ
・ラッド社のHRP Color Development Reagentを用
いて、発色させた。その結果、第1・4図に示すと
おり、 $CB1$ もヒト IgGもほぼ同じ位置にバンドが検

出って、これらキメラ抗体産生細胞の産生するキ
メラ抗体は、gp120に対する特異性を持ち、なおか
つ L 鎖も L 鎖もヒト型化していることが示唆された。
また、ヒトポリクローナル IgGを用いた検量線から、
その発現量を推定すると、 1×10^7 個の細胞が約10 μ gの
培養上清中に約0.5~5 μ g/mlの範囲で抗HIVキメラ
抗体を産生していることが認められた。実施例(8)
で確立した抗HIVキメラ抗体産生細胞の中から、再
クローニングにより5~8 μ g/mlのキメラ抗体を産生
している細胞($CB1$ 細胞)を選び、以下に述べる実
験に使用した。なお、この細胞は、4ヶ月のスピナー
フラスコで1ヶ月間培養しても、その産生量を低下
させることはなく、キメラ抗体を安定して産生し
ていた。このような抗HIV中和キメラ抗体を産生す
る形質転換細胞 $CB1$ は、農研研菌寄第10100号として
本出版により登録されている。

次に、キメラ($CB1$)抗体のmRNAが正常に作られて
いるか否かを調べた。 $CB1$ 抗体産生細胞及びその
親株であるP3X63Ag8-653(P3-653)からmRNAを抽出
し、0.5 β VII遺伝子(gHII)、0.5 β V κ 遺伝子(gL41)、

出された。そのサイズは、 H_2L_2 で約160k、 H で約50k、
 L で約28kであった。このことより、この $CB1$ キ
メラ抗体は、抗体分子として正常な形をとっている
ものと思われる。

(11) 抗HIVキメラ抗体の活性

今回キメラ化に使用したマウス0.5 β 抗体は、
HIVのgp120に対して特異性のある抗体であるが、
このキメラ化した $CB1$ 抗体がgp120に対して
特異性を示すか否かを、HIV粒子を用いたウエスタン
プロット分析で検討した。HIV粒子を可溶化して
SDS-PAGEを行い、先述のように、ニトロセルロ
ースフィルターへトランスファーした。このフィル
ターにマウス0.5 β 抗体、 $CB1$ 抗体、ヒト正常血清
及びヒトHIV陽性血清をそれぞれ反応させ、マウス
0.5 β 抗体の場合はペルオキシダーゼ標識抗マウス
IgG抗体(Cappel lab. Inc.)で、それ以外はペルオ
キシダーゼ標識ヒト IgG抗体(Cappel lab. Inc.)で、
HRP Color Development reagent(バイオ・ラッド)
を用いて染色した。その結果、第1・5図に示すよ
うに、マウス0.5 β 抗体と同様、 $CB1$ 抗体ははつき

りとgp120と反応していることが示された。

次に、このCB1抗体がHIV感染細胞と反応するか否かを調べた。方法は、HIV感染B9細胞にCB1抗体を使用させ、ファクスター(ベクトン・デッキンソン)を用いて分析した。第1~6図に示すように、CB1抗体は、正常ヒトIgGに比べて蛍光強度がシフトしており、このことより、HIV感染細胞上のgp120抗原をCB1は認識しているものと思われる。

次に、CB1抗体のHIV中和活性を検討した。初めに、HIV感染細胞の合胞体形成システムを用い、CB1抗体の合胞体形成阻害能を検討した。即ち、HIVを產生しているLAV感染CEM細胞と未感染のCEM細胞を混合培養すると、24時間後には合胞体形成が認められるが、LAV感染細胞をCB1抗体であらかじめ処理して未感染CEM細胞と混合培養すると、合胞体形成が100%抑制された(第1~7図)。従って、CB1抗体にはcell to cell感染防御能が期待できる。

次に、CB1抗体のHIV粒子感染阻止能を検討した。即ち、HIV(LAV)粒子をMT4細胞に感染させ、3日間培養すると、LAV感染の結果生じる巨細胞形成が認められるが、CB1抗体であらかじめ処理して未感染CEM細胞と混合培養すると、巨細胞形成が認められない。

第2図は、実験例(2)で調製したVII領域遺伝子と54°CBI細胞のmRNAとのノーザンハイブリダイゼーションの解析結果を示すX線写真的模式図である。

第4図は、実験例(2)で調製したV_κ領域遺伝子と54°CBI細胞のmRNAとのノーザンハイブリダイゼーションの解析結果を示すX線写真的模式図である。

第5図および第7図は、それぞれ本発明のVII領域遺伝子およびV_κ領域遺伝子のDNA塩基配列の一例を示したものである。

第6図および第8図は、それぞれ本発明のVII領域遺伝子およびV_κ領域遺伝子のアミノ酸配列の一例を示したものである。

第9図は、抗HIVキメラ抗体L遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

第10図は、抗HIVキメラ抗体L遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

第11図は、抗HIVキメラ抗体L遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

められるが、LAVをCB1抗体であらかじめ処理しておくと、巨細胞形成は認められず、感染が成立しない(第1~8図)。さらに、このような細胞の中から感染細胞を抗P24モノクローナル抗体(セルラー・プロダクツ社)を用い間接蛍光抗体法にて認定しても、P24抗原の発現は認められない。従って、CB1抗体には、HIV粒子感染阻止能があると思われる。前述の2つの結果から、CB1抗体は、HIV中和活性を有していると思われる。

このように上記(10)、(11)の結果より、HIV外皮膜蛋白gp120と特異的に結合するマウス0.5S抗体の可変領域(V_H、V_C)を有し、定常領域がヒトIgG抗体(Cy1、C_y)であるマウスヒトキメラ抗体が、完全な免疫グロブリン(H₂L₂)の形で本形質転換細胞(CB1細胞)から発現産生されていることが証明された。

4. 図面の簡単な説明

第1図および第3図は、それぞれ実験例で調製したVII領域遺伝子およびV_κ領域遺伝子の新規酵素切断点地図である。

例である。

第12図は、抗HIVキメラ抗体L遺伝子およびL遺伝子を含む発現型プラスミドを得る系統図を示したものの一例である。

第13図は、抗HIVキメラ抗体を產生している細胞のmRNAと実験例(2)で調製したVII、V_κ領域遺伝子、及び実験例(3)で調製したヒトCy1、C_y領域遺伝子とのノーザンハイブリダイゼーションの解析結果を示すX線写真的模式図である。

第14図は、抗ヒトIgG抗体を用いた抗HIVキメラ抗体蛋白のウエスタンプロット分析の解析結果を示した模式図である。

第15図は、抗HIVキメラ抗体を用いた可溶化HIV粒子のウエスタンプロット分析の解析結果を示した模式図である。

第16図は、抗HIVキメラ抗体を用いたHIV感染細胞のファクスター分析の解析結果を示している。

第17図は、抗HIVキメラ抗体の合胞体形成阻止活性を示した細胞写真である。

第18図は、抗HIVキメラ抗体のHIV感染阻止活

性を示した相應写真である。

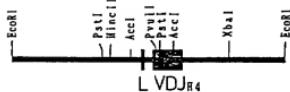


図 1 図

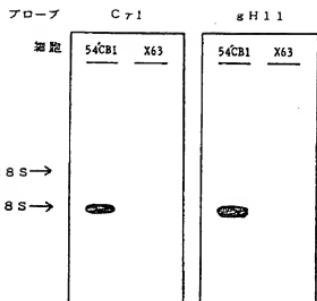


図 2 図

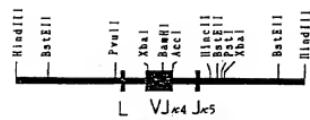
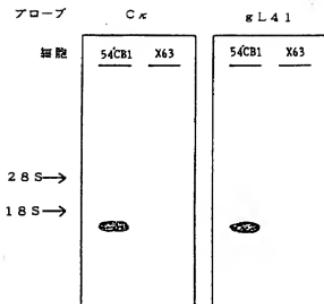


図 3 図



_____ はエクソン部分を示す

#297-

CTTATCTAAG ATGTACCGTG CTATGATAA TCCAATCT TGCACTCAG TGATTATAGA
 GAAGACTG CTTATCGTT TATATAAGGA TGTCCTACCC CCACAAACAA TAAGATCAGT
 CTTCCTATA ATCACCTAGT GCACAGGACC TCACAAATGGC GTGAGATCT ATCACCTCT
 TCTCTAGCC AACAGCTATA GTTAACGGGGC TCACAGTTT AAACCTCAAG AGAGGCCATA
 CATTCATGTC ACATCTACTC TGCCTTCTC TCCACAGGG TCCACTCOSA CGTTCAGCTG
 CAGGACGTCG GGGCTGAGCT GTGCAACCTT GGCGGCTCAG TGAGATCTC CTSCAAGCT
 TTGGCTACA CCTTCAGTAC CTATCCAATA GAGTGGATGA AACAGAATCA TCGGAAGAGC
 CTAGACTGGA TTGGAAATTTC TCATCTTAC AGTGTGATATA CTAACTACAA TGAAAATTC
 AAAGGCAAGG CCAAAATGAC TGAGAAAAA TCTCTACCA CAGGACTTCT GGAGTTCTAC
 CGATTAACT CTGATGACTC TGCTGTTAT TACTCTACCA TACACTACCG TAGTGCTCTAC
 CCTATGACT ACTGGGGCTCA AGGACCTCA CTACCCCTCA CTTCAGGTTA AGAATGGCTC

BPS 5 23

Met Ala Trp Ile Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Ile
 Gly Val His Ser Glu Val Glu Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Leu
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly
 Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Pro Ile Glu Trp Met Lys Glu Asn His
 Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Phe His Pro Tyr Ser Asp
Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr
 Val Glu Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Leu Glu Phe Ser Arg Leu
 Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ile His Tyr Gly
Ser Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Glu Glu Gly Thr Ser Val Thr
Val Ser Ser

_____ はN末アミノ酸: _____ は本発明の特異配列

BPS 6 23

_____ はエクソン部分を示す

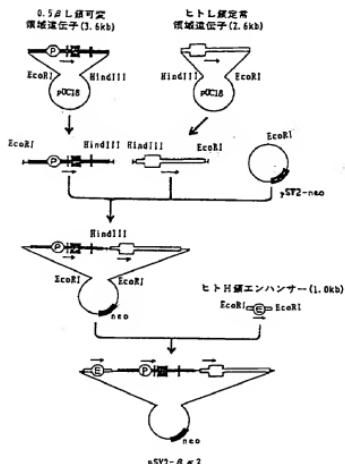
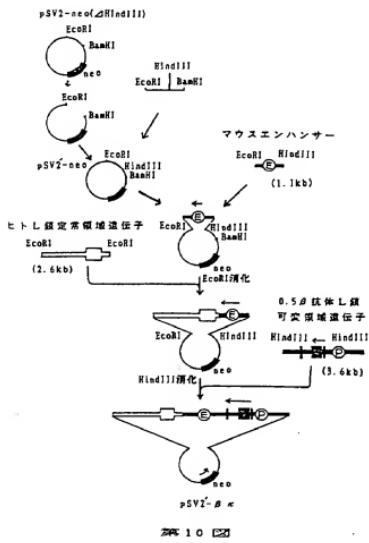
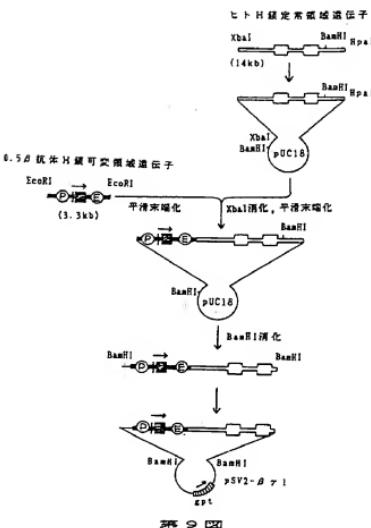
#297-

CTTGGAGCAA CAGCACATAC TCTGCTGATT TGCAATATGAA ATAATTTTAT AACAGCCAG
 GCTTCTTAA GCGAGCTCC AGGACCTTA GAGACATC CTACATCTAGT TCTCAGAGAI
 GAAGCAGAC ACATACTTC TATGGCTGCT GCTGCTTCTG GTTCCAGTG AGACTCCAGA
 GAATGTTGG GAGCAACCTC TCGGACCATC ATGACTTTTC ATGCAATATG ACTCCTGAAT
 GTTATAATTA ATACATTGTT AATTTGTTT AAGTTCTGCTG ATTCCCTTC ATTCTCTGAT
 GTCTCATTT GATOTCACA GTATTCTTA TATTTTAAA TGAATGGAA ATGCTTTTAT
 ACATATATAA CAATTGCTG TGTGTTTATC ATTCAGGT CTACTGGTTA CATTTGCTG
 ACCCAATCTC CAGCTTCTTC GGTGTTGCTT CTAGGGAGA GGCGAACCAT CTCTCTGCAAG
 GCGACGGCCAC CCAAACTCTC CTCATCTAGT GCATCTCAATC TAGAAATCTGG GATTCAGGC
 AGGTTTGGTG CTAGGGCTC TAGGACAGAC TICACCTCA ACATTCATC TGTGAGGAG
 GAGGGCTGCTG CAACCTTAA CTGTCAGCAA AGTAAATAGC ATTCATCAC GTCGGCTG
 GGGACAAAGT TGAATTTAA ACCTAAAGTG ACTTTGCTC ATTACCTTAT GACCTTITG

BPS 7 23

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val
 Pro Gly Ser Thr Gly **Asp** Ile Val **Lys** Ala Ser Pro Ala Ser
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys **Lys** Ala
Ser Gln **Ser** Val **Asp** Tyr **Asp** Gly **Asp** Ser **Ter** Met Asn Trp Tyr
 Gin Gin Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile **Tyr** Ala Ala
Ser Asn Leu Glu Ser **Gly** Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys **Gin** **Gln** **Ser** Asn Asn **Asp** **Pro** **Phe**
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

はN末端アミノ酸配列分析で確認された配列
は本発明の特異配列



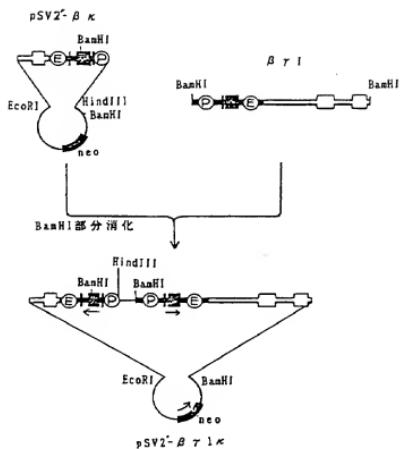


図 1 2

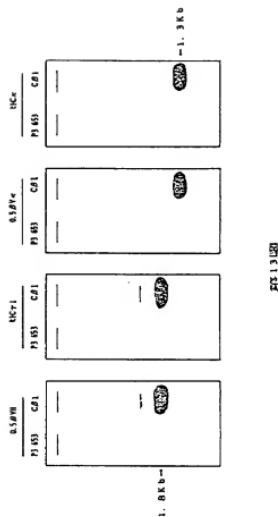
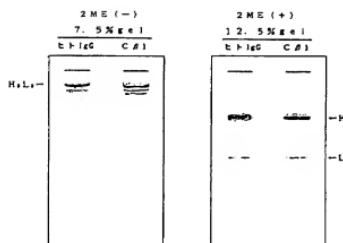
ヒト正常血清
ヒトHIV陽性血清

図 1 4

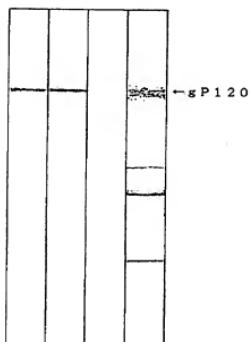


図 1 5

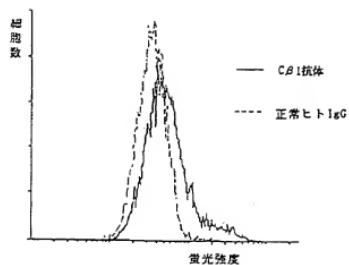
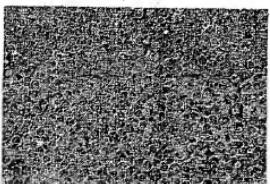


図 16

C91抗体存在下(倍率X100)



C91抗体不存在下(倍率X100)

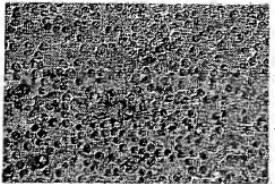
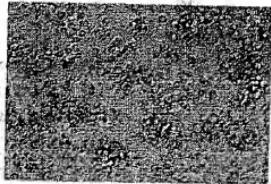


図 17

C91抗体存在下(倍率X100)



C91抗体非存在下(倍率X100)

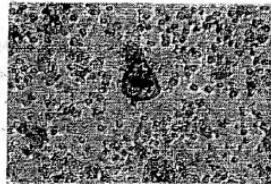


図 18

第1頁の続き

⑤ Int. Cl. 5 識別記号 庁内整理番号

||(C 12 N 15/13
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/08
C 12 R 1:91)

②発明者 松下修三 熊本県熊本市水前寺2-22-22
②発明者 服部俊夫 熊本県熊本市新大江1-14-10 ライオンズマンション新
大江104号
②発明者 高月清 熊本県熊本市渡鹿1丁目16-3-54

手 續 補 正 書 (方 式)

平成元年 1月

特許庁長官 吉田文義殿

1. 事件の表示

昭和63年 特許第 171385号

2. 発明の名称

これらを用いて発現された抗HIVキメラ抗体ならびにその製法

3. 振正をする

豪傑との關係 携持出願人

佐原 岡本組 調査課 木深668番地

名称 財團法人化粧品審議研究会

九月刊 実業出版社

卷之三

住所 球本県熊本市清水町大塩668番地
財団法人 化学及清浄法研究所
〒860 電話 096(344)1211

氏名 井理士(8767) 同 井 道

5. 補正命令の日付(発送日)
昭和63年9月27日

6. 補正の対策

委任状、明細書の図面の簡単な説明の欄および
図面

7. 補正の内容

- (1) 待許法第42条の第1項の優先権主張に関する委任状を別紙の通り補充する。

(2) 明細書第54頁18行目から第55頁第1行目までの第17図および第18図の説明を下記の通り補正する。

「第17図は、CB1抗体存在下においてLAV感染CEM細胞と未感染CEM細胞を混合培養した場合のCEM細胞(生物)の形態、およびCB1抗体非存在下においてLAV感染CEM細胞と未感染CEM細胞を混合培養した場合のCEM細胞(生物)の形態を示す顕微鏡写真である。

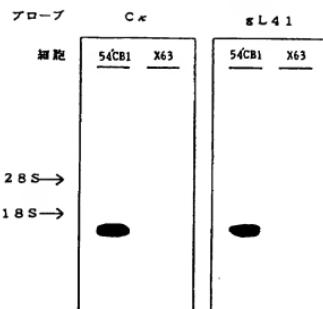
第18図は、cB1抗体存在下においてLAVをHT4細胞に感染させた細胞を3日間培養した場合のHT4細胞の形態、およびcB1抗体非存在下においてLAV



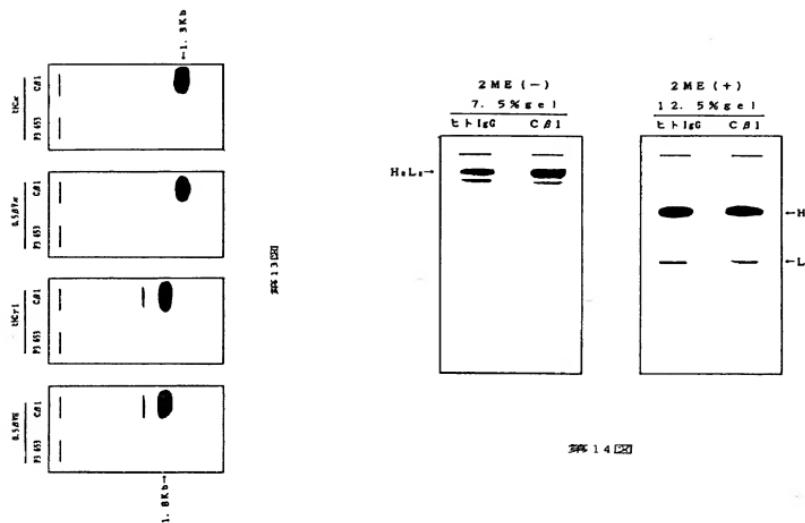
をMT4細胞に感染させた細胞を3日間培養した場合のMT4細胞(生物)の形態を示す顕微鏡写真である。」

(3) 第4図、第13図、第14図および第15図を別紙のとおり補正する。

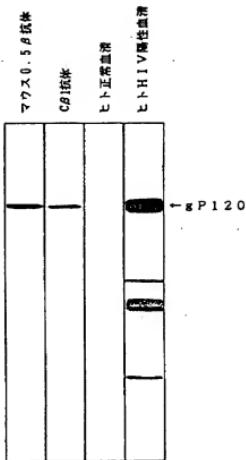
(第17図ならびに第18図の補正の理由は、上記(2)の図面の簡単な説明の欄の補正により弊消したものと確信いたします。)



第4図



第14図



図版15